

福井大学重点研究 「競争的配分経費」

疾患関連ペプチドの凝集体成長過程の動的標識法の開発

研究代表者：今野 卓（医学部医学科、准教授）

電話：0776-61-8627、メールアドレス：konno@u-fukui.ac.jp

概 要	我々が継続的に行っている研究は、ポリペプチド鎖分子が生み出す繊維性凝集体（いわゆるアミロイド凝集体）の複雑な生成機構について、ペプチド工学的手法と凝集過程の分子科学的解析手法を融合させてアプローチするものであり、一方では難治性のヒト変性疾患の治療・解明に関わり、他方では生体分子を用いたナノ構造体のデザイン・作成への寄与を意図している。本年度は、凝集体の動的・静的な構造を測定するための進んだ技術の試みを幾つか（DXT法、X線結晶回折など）進めるとともに、凝集体の生成過程や構造を制御するペプチド工学的な試みを幾つか行った。さらに、以上の実験結果の理論的基礎付けのために、計算機シミュレーションによって凝集体の静的・動的構造を <i>in silico</i> に構成する研究も進めた。
関連キーワード	アミロイド、ペプチド凝集、DXT法、変性疾患、ナノ材料

研究の背景

ポリペプチド分子の会合体形成は、あらゆる生命過程の中枢に関わり、多彩な分子構造体を生み出す。その分子集合過程の理解は生命の本質や諸疾患の病理の解明に不可欠であり、薬剤デザイン的基础でもある。また、ペプチド会合体の構造とその強度を自在に制御できれば、生体分子を素材にしたナノ材料の創成が可能となる。この範疇に属する分子集合現象は数多いが、本研究では、特

に、アルツハイマー病やプリオン病をはじめとする難治性のヒト変性疾患に関わる繊維性凝集体（いわゆるアミロイド）の形成過程を研究対象として選んだ。この現象の解明と応用とを共に視野に入れた立場からの基礎研究が我々の継続的な研究課題であり、過去5年間に採択された競争的配分経費課題及び学部間共同研究課題の対象でもある。

研究の目的

アミロイド形成の原理を解明し、アミロイド様ナノ構造体の形態や強度の人為的制御を達成するために我々が進めてきた分子デザイン+実験+理論解析の総合的研究法の有効性は、過去の論文発表等で示された。しかし、ペプチド凝集体の成長過程の各段階をよく区別して、そのそれぞれで形成される会合物の静的・動的構造を詳細に解析するには、既存の測定手法では不十分であることも明らかである。この状況は、アミロイド研究の場合に限らず、生命現象に関わる全ての大きな分子

集合体の形成過程の解明に、例外なく当てはまる。本年度の研究は、この課題の解決に向けて、複数の先進的な測定法・解析法を併用するアプローチを試みた。その研究は今後も継続的に進められ、十分な成熟段階に達すれば、アミロイド凝集の様々な段階の構造体の詳しい物性解析とそれらの人為的な制御が可能となり、アルツハイマー病などの難治疾患の解明・診断・治療や新規バイオマテリアルの合理的な開発への大きな寄与となる。

研究の成果

(1) 金ラベルしたペプチド凝集体の動的測定の試み

チャネル分子の1分子動的測定に適用した手法（DXT法；Cell, 2008）は、生体分子集合体の内部構造変化の実時間測定のための新たな手法となりえる。この手法を発展させるため、本年度は以下の初期的段階を進めた。

①分子をラベルする金ナノ結晶の粒子形やサイズを精確に制御することは、単一結晶から得られる散乱データの再現性と正しい解釈に不可欠である。この面での改善を行うため、液相法、気相法など様々な手法で作成された金ナノ結晶を電子顕微鏡等で評価し、その後放射光を照射して得た結果を系統的に検討した。

②高速な分子内運動を追跡可能とするための新たな測定系の構築を Spring8 と Swiss Light Source で行った。

③幾種類かのアミロイド凝集体に非共有結合で取り込ませた金ナノ結晶から発する散乱の実時間測定を行い、アミロイド凝集体の示す揺らぎを観測した (図1)。

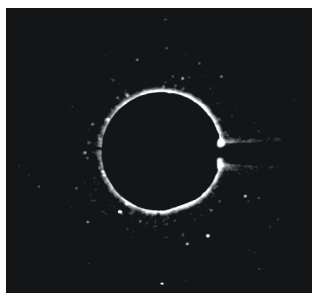


図1：アミロイド凝集体に結合した金ナノ結晶からの散乱点 (小さなスポット状の輝点がそれぞれ単一金結晶からの散乱点)

(2) その他の凝集過程・構造の解析手法の検討

①凝集体の原子レベルでの構造を決定する目的で X 線結晶構造解析を行うため、凝集体の微結晶の作成を進めている。その前段階として、非結晶性の凝集体サンプルに放射光を照射することにより、 β シート周期構造を示す粉末パターンの散乱を得ている (図2)。

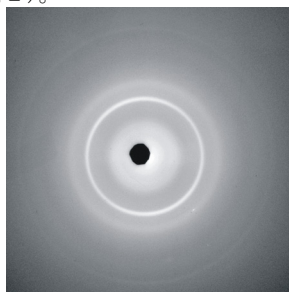


図2：ペプチド凝集体からのX線散乱

②固体 NMR 法による原子構造解析のためのサンプル準備も進めている。また、全反射蛍光顕微鏡を用いて繊維性凝集過程を実時間観測するため、機器導入を含めて検討を進めている。

(3) ペプチド工学的手法による凝集制御の試み

我々の用いる凝集性ペプチド配列の主なもの、タウ分子の2つの異なる部位を基本骨格とする (それぞれ SPHF6、CORE1S と呼ばれる)。これらのペプチド凝集の速度過程と最終産物の構造・安定性を制御するために、ペプチドの化学構造や相互作用するペプチドの組み合わせを変化させる試みを系統的に進めている。

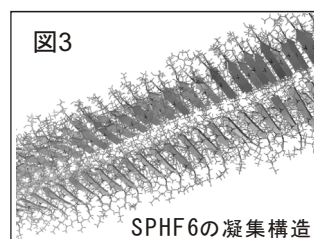
①ペプチド内電荷分布の操作による制御

SPHF6、CORE1S とともに、配列の様々な部位に電荷をもつアミノ酸を導入することができる。とりわけ S (セリン) や Y (チロシン) の部位には、それらのリン酸化を導入することができる。このリン酸化は電荷状態を変えるのみならず、ヒトの諸疾患との関連においても重要な意味をもつ。ペプチド上の電荷分布を変化させることにより、凝集体内での隣接ペプチド鎖間に働く静電的相互作用を操作することができ、凝集速度過程や産物の構造形態とその安定性を合理的に改変することが可能となる。本年度のこの手法での成果の一部は既に論文となっている。

②異種ペプチドの混合による制御

①の手法の拡張として、互いに電荷分布の異なる2種のペプチドを様々な比率で混合した溶液中で凝集を誘導することにより凝集の様々な特性を制御する試みを進めている。上記の発表論文には、この手法を用いた成果も含まれている。

(4) 計算化学的手法による凝集体のミクロ構造解析



他のグループが既に報告している凝集構造の原子座標を基本骨格として、我々が用いているペプチドの場合の凝集体の構造を計算化学的に構成し (図3)、それを用いて、水和水を含めた凝集体のミクロな動的構造の解析を、分子動力学法を用いて進めている。

特記事項・発表論文など

「特記事項」本研究は、京都大学エネルギー理工学研究所・森井孝教授のグループとの共同で実施された。

「本研究に関わる発表論文」

M. Inoue, A. Hirata, K. Tainaka, T. Morii and *T. Konno “A charge-pairing mechanisms of phosphorylation effect upon amyloid fibrillation of human tau core peptide” *Biochemistry* (2008) 47,

11847-11857

T. Kimura, A. Maeda, S. Nishiguchi, K. Ishimori, I. Morishima, T. Konno, Y. Goto and *S. Takahashi “Dehydration of mainchain amides in the final folding step of single chain monellin revealed by time-resolved infrared spectroscopy” (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 13391-13396